

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-253854

(43) 公開日 平成6年(1994)9月13日

(51) Int.Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	F 1	技術表示箇所
C 1 2 N 15/51	Z N A	7236-4B		
		9359-1E		
		7432-4E		
C 1 2 P 19/38		9050-4E		
		C 1 2 N 15/00	A	

審査請求 未請求 請求項の数9 F D (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-63515

(71) 出願人 000006770

ヤマサ醤油株式会社

千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1

(22) 出願日 平成5年(1993)2月26日

(72) 発明者 野口 利忠

千葉県銚子市西小川町4399番地6号

(72) 発明者 奥山 肇

千葉県佐倉市鍛冶町2丁目6番地13号

(72) 発明者 浜本 智樹

千葉県銚子市新生町2丁目2番地1号

(72) 発明者 緑川 祐一郎

千葉県銚子市海鹿島町5201番地7号

(54) 【発明の名称】 組換えDNA手法によるヌクレオシド・ホスホリラーゼの製造法

(57) 【要約】

【目的】 ヌクレオシド・ホスホリラーゼを用いた効率的なヌクレオシドアナログ合成を可能とするため、組換えDNA手法によるヌクレオシド・ホスホリラーゼの大量製造を目的とする。

【構成】 ヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含むDNA分子、それを用いた組換えDNA手法によるヌクレオシド・ホスホリラーゼの製造、および該方法で得られた培養物、微生物菌体、またはその処理物を酵素源として使用するヌクレオシドの製造法に関する。

* 本表係根據 1990 年 12 月 31 日之調查資料編造。資料來源：行政院主計處。

(式1)

YetAsnAngThrIleAlaLeuGluGlnAlaAlaValIlePheLeuLysGluLysPheProThrSer	20	30
ProGlnIleGlyLeuIleLeuGlySerGlyLeuGlyValLeuAlaAspGluIleGluGln	30	40
AlaLeuLysIleProTyrSerAspIleProAspPheProValSerThrValGluGlyHis	50	60
AlaGlyGlnLeuValTyrGlyGlnLeuGlyGlyPheThrValValValMetGlnGlyArg	70	80
PheHisTyrTyrGluGlyTyrSerPheAspLysValThrPheProValArgValMetLys	90	100
AlaLeuGlyValGluIleLeuIleValThrAspAlaAlaGlyGlyValAsnGluSerPhe	110	120
GluProGlyAspLeuMetIleIleSerAspHisIleAsnAsnYetGlyGlyAsnProLeu	130	140
IleGlyProAspAspSerAlaLeuGlyValArgPheProAspYetSerGluAlaTyrSer	150	160
LysAngLeuAngGlnLeuAlaLysAspValAlaAsnAspIleGlyLeuArgValArgGlu	170	180
GlyValTyrValAlaAsnThrGlyProAlaTyrGluThrProAlaGluIleArgMetIle	190	200
ArgValMetGlyGlyAspAlaValGlyYetSerThrValProGluValIleValAlaArg	210	220
HisAlaGlyMetGluValLeuGlyIleSerCysIleSerAsnMetAlaAlaGlyIleLeu	230	240
AspGlnProLeuThrHisAspGluValIleGluThrThrGluLysValLysAlaAspPhe	250	260
LeuArgPheValLysAlaIleValArgAspMetAlaLysAsn	270	

I

【請求項1】 アミノステロイド・オキサステロイド構造を有する化合物の配列を含有する、請求項1記載のRNA分子。

[illegible]

(3)

特開平6-253854

3	10	20
MetArgMetValAspLeuIleGluLysLysArgAspGlyHisAlaLeuThrLysGluGlu		
30	40	
IleGlnPheIleIleGluGlyTyrThrLysGlyAspIleProAspTyrGlnMetSerAla		
50	60	
LeuAlaMetAlaIlePhePheArgGlyMetAsnGluGluGluThrAlaGluLeuThrMet		
70	80	
AlaMetValHisSerGlyAspThrIleAspLeuSerArgIleGluGlyIleLysValAsp		
90	100	
LysHisSerThrGlyGlyValGlyAspThrThrThrLeuValLeuGlyProLeuValAla		
110	120	
SerValGlyValProValAlaLysMetSerGlyArgGlyLeuGlyHisThrGlyGlyThr		
130	140	
IleAspLysLeuGluSerValProGlyPheHisValGluIleThrAsnAspGluPheIle		
150	160	
AspLeuValAsnLysAsnLysIleAlaValValGlyGlnSerGlyAsnLeuThrProAla		
170	180	
AspLysLysLeuTyrAlaLeuArgAspValThrAlaThrValAsnSerIleProLeuIle		
190	200	
AlaSerSerIleMetSerLysLysIleAlaAlaGlyAlaAspAlaIleValLeuAspVal		
210	220	
LysThrGlyValGlyAlaPheMetLysAspLeuAsnAspAlaLysAlaLeuAlaLysAla		
230	240	
MetValAspIleGlyAsnArgValGlyArgLysThrMetAlaIleIleSerAspMetSer		

(I I) その1

【式3】

157 160
 LeuProLeuGlyTyrAlaValLeuGlyAspAlaLeuGlyValLeuValLeuAspTyrLeu
 170 180
 LysGlyGlyGlyTyrProGluAspPheLeuGluLeuLysLeuValLeuGlySerHisMetVal
 190 200
 TyrLeuAlaGlyLysAlaGluSerLeuLeuGlyGlyAlaAngLysPheLeuGlyLysAlaMet
 210 220
 LysAspGlySerAlaLeuGlnTyrPheLysPhePheLeuAlaAlaGlyGlyGlyAspAla
 230 240
 SerValValAspAspPheSerLysLeuPheGlnAlaGlyTyrIleIleGluLeuGluAla
 250 260
 LysGluAspGlyTyrValGluGluAlaValAlaAspAlaValGlyThrAlaAlaMetTrp
 270 280
 LeuGlyAlaGlyAngAlaThrLysGluSerThrIleAspLeuAlaValGlyLeuValLeu
 290 300
 AngLysLysValGlyAspAlaValLysLysGlyGluSerLeuValThrIleTyrSerAsn
 310 320
 AngGluGlnValAspAspValLysGluLysLeuTyrIleAsnIleAngIleSerAlaThr
 330
 ProValGlnAlaProThrLeuIleTyrAspLysIleSer

(I 1) その2

【請求項4】 ビリミジンタクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の下流にS/D配列を含有する、請求項3記載のDNA分子。

【請求項5】 細胞内で複製可能なベクターの発現制御シグナルの下流に請求項1および/または3記載のDNA分子を組み込んでなる、組換えベクター。

【請求項6】 発現制御シグナルが大腸菌内で作用するプロモーターを少なくとも含むものである、請求項5記載の組換えベクター。

【請求項7】 請求項5記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養して当該酵素を生産させた、好熱菌由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼを保持する微生物菌体を含有する培養物。

【請求項8】 請求項7記載の培養物から分離した好熱菌由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼを保持する微生物菌体、またはその処理物。

【請求項9】 塩基供与体、糖残基供与体及び/又は酸供与体をヌクレオシド・ホスホリラーゼを含有する酵素調製物を用いて反応させ、塩基供与体の塩基部分と糖残基供与体の糖部分との間にリンゲージ結合を形成させてヌクレオシドを製造する方法において、ヌクレオシド・ホスホリラーゼを含有する酵素調製物として請求項7または8記載のものを使用することを特徴とする、ヌクレオシドの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、バクテラス属に属する好熱菌由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼの組換えDNA手法による製造法および該方法で得られた酵素のヌクレオシド製造への応用に関するものである。

【0002】

【従来の技術】核酸系化学療法剤は、抗腫瘍、免疫抑制、抗ウイルスなどの種々に用途に使用されている。また、近年のエイズの流行とともにヌクレオシドアナログの抗ウイルス作用が注目され、種々のヌクレオシドアナログが合成され、その抗ウイルス活性が試験されている（化学と生物、第27巻、第6号、第356～366頁）。従来、これらのヌクレオシドアナログの多くは化学的に合成されてきたが、微生物由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼを利用することにより数々のヌクレオシドアナログを効率的に調製できる事が明らかになるにつれて、該酵素の利用はヌクレオシドアナログ合成の重要な手段となっている（発酵と工業、第27巻、第11号、第907～937頁）。

【0003】

一般に、酵素の調製法としては操作用であるいは経済性、或は微生物が有利である。ヌクレオシド・ホスホリラーゼは、動物、微生物など種々の生物に存在することが確認されており、そのいくつかは単離精製

されて酵素学的諸性質が報告されている。たとえば、バシラス属に属する好熱菌の一種であるバシラス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) に関してもヌクレオシド・ホスホリラーゼの存在が確認されている。すなわち、プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ (E.C. 2. 4. 2. 1.)、ピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ (E.C. 2. 4. 2. 2.) と同該微生物より単離精製され、その諸性質も報告され (J. Biol. Chem., 244, 3691 (1969), Agric. Biol. Chem., 53, 2205 (1989), Agric. Biol. Chem., 53, 3219 (1989))、それらの酵素を利用したヌクレオシドアナログの合成も報告されている (Agric. Biol. Chem., 53, 197-202 (1989), 特開昭56-166199号公報、特開昭56-164793号公報、特開平1-320995号公報)。

【0004】山内らは、バシラス属に属する好熱菌から耐熱性があり比活性が高いヌクレオシド・ホスホリラーゼ (プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ及びピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ) を有するバシラス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 7H6-2株を見だし、該菌株からヌクレオシド・ホスホリラーゼを単離することに成功した (国際特許公開 WO 90/110080号、日本農芸化学会誌、第63巻、第3号 (1989年度大会講演要旨集)、第283頁)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】山内らの見いだした上記の酵素は極めて優れた酵素ではあるが、ヌクレオシド製造の酵素源として上記微生物の菌体自体を使用する場合、孢子形成に伴う自己溶菌により反応液中に酵素が離脱し、ヌクレオシドの連続的な合成に悪影響を及ぼしたり、溶菌に伴う菌体蛋白質の流出がヌクレオシドの合成および精製に支障をきたすという欠点を有していた。また、微生物の菌体を酵素源として使用する場合の一般的な問題として、菌体内に含まれる種々の酵素により基質

もし、は生成物の分解などの副反応が生じ、生成物の収率の低下を招くという問題があることを常に認識しておかなければならない。

【0006】このような微生物菌体を酵素源として使用する方法の問題点を解決するため、精製酵素標品を酵素源として用いる方法も考えられてはいるが、バシラス・ステアロサーモフィラスは、蛋白質分解活性を有し、ヌクレオシド・ホスホリラーゼの生産量も少なく、かつ該酵素の精製操作も煩雑であることから、該菌株からヌクレオシド・ホスホリラーゼを収率よく回収することは事実上困難なことであった。

【0007】上記の問題を克服するための第一歩として、山内はバシラス・ステアロサーモフィラス由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼをコードする遺伝子を含有するDNA断片を大腸菌にクローニングし、当該酵素が大腸菌において生産できることを見いだした (特開平4-4882号公報)。しかしながら、該方法で造成された組換え大腸菌におけるヌクレオシドホスホリラーゼの生産量は好熱菌におけるその生産量と同等以下であり、これをヌクレオシド製造の酵素源として使用したとしても、到底実用化に耐えうるものではなかった。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記問題点を解決すべく鋭意検討した結果、バシラス・ステアロサーモフィラス由来のヌクレオシドホスホリラーゼをコードするDNAの一次構造を解析し、この解析結果をもとに組換えDNA手法により大腸菌において該酵素を大量生産させることに成功し、本発明を完成させた。

【0009】すなわち、本発明は、バシラス属に属する好熱菌に由来し、下記式(1)のアミノ酸配列をコードするプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA分子に関するものである。

【0010】

【式4】

	位置	時間+6	5 3 3 5 4
	10	20	
MetAsnArgThrAlaLeuGluAlaAlaThrPheLeuLysGlyGlyPheProThrSer	30	40	
ProGlnIleGlyLeuIleLeuGlySerGlyLeuGlyValGluAlaAspGluIleGluGln	50	60	
AlaIleLysIleProTyrSerAspIlePheAsnThrPheValSerThrValGluGlyHis	70	80	
AlaGlyGlnLeuValTyrGlyGlnLeuGlyIleAlaThrValValValMetGlnGlyArg	90	100	
PheHisTyrTyrGlyGlyTyrSerPheAsnLysValThrPheProValArgValMetLys	110	120	
AlaGluGlyValGluGlnLeuIleValThrAsnAlaAlaGlyGlyValAsnGluSerPhe	130	140	
GluProGlyAspGluMetIleIleSerAspHisIleAsnAsnMetGlyGlyAsnProLeu	150	160	
IleGlyProAsnAspSerAlaLeuGlyValArgPhePheAspMetSerGluAlaTyrSer	170	180	
LysArgGluArgGlnLeuAlaLysAspValAlaAsnAspIleGlyLeuArgValArgGlu	190	200	
GlyValTyrValAlaAsnThrGlyProAlaTyrGluThrProAlaGluIleArgMetIle	210	220	
ArgValMetGlyGlyAspAlaValGlyMetSerThrValProGluValIleValAlaArg	230	240	
HisAlaGlyMetGluValLeuGlyIleSerCysIleSerAsnMetAlaAlaGlyIleLeu	250	260	
AspGlnProLeuThrHisAspGluValIleGluThrThrGluLysValLysAlaAspPhe	270		
LeuArgPheValLysAlaIleValArgAsnMetAlaLysAsn			

(I)

【0011】また、本発明は、バシラス属に属する好熱菌に由来し、下記式(1)のアミノ酸配列をコードするピリミジンヌクレオチド・ホスホリライゼ構造遺伝子

を含有するDNA分子に関するものである。

【0012】

【式8】

(7)

特開平6-253854

11

12

10

20

MetArgMetValAspLeuIleGluLysLysArgAspGlyHisAlaLeuThrLysGluGlu

30

40

IleGlnPheIleIleGluGlyTyrThrLysGlyAspIleProAspTyrGlnMetSerAla

50

60

LeuAlaMetAlaIlePhePheArgGlyMetAsnGluGluGluThrAlaGluLeuThrMet

70

80

AlaMetValHisSerGlyAspThrIleAspLeuSerArgIleGluGlyIleLysValAsp

90

100

LysHisSerThrGlyGlyValGlyAspThrThrThrLeuValLeuGlyProLeuValAla

110

120

SerValGlyValProValAlaLysMetSerGlyArgGlyLeuGlyHisThrGlyGlyThr

130

140

IleAspLysLeuGluSerValProGlyPheHisValGluIleThrAsnAspGluPheIle

150

160

AspLeuValAsnLysAsnLysIleAlaValValGlyGlnSerGlyAsnLeuThrProAla

170

180

AspLysLysLeuTyrAlaLeuArgAspValThrAlaThrValAsnSerIleProLeuIle

190

200

AlaSerSerIleMetSerLysLysIleAlaAlaGlyAlaAspAlaIleValLeuAspVal

210

220

LysThrGlyValGlyAlaPheMetLysAspLeuAsnAspAlaLysAlaLeuAlaLysAla

230

240

MetValAspIleGlyAsnArgValGlyArgLysThrMetAlaIleIleSerAspMetSer

(I I) その1

【式6】

177
 180
 183
 186
 189
 192
 195
 198
 201
 204
 207
 210
 213
 216
 219
 222
 225
 228
 231
 234
 237
 240
 243
 246
 249
 252
 255
 258
 261
 264
 267
 270
 273
 276
 279
 282
 285
 288
 291
 294
 297
 300
 303
 306
 309
 312
 315
 318
 321
 324
 327
 330
 333
 336
 339
 342
 345
 348
 351
 354
 357
 360
 363
 366
 369
 372
 375
 378
 381
 384
 387
 390
 393
 396
 399
 402
 405
 408
 411
 414
 417
 420
 423
 426
 429
 432
 435
 438
 441
 444
 447
 450
 453
 456
 459
 462
 465
 468
 471
 474
 477
 480
 483
 486
 489
 492
 495
 498
 501
 504
 507
 510
 513
 516
 519
 522
 525
 528
 531
 534
 537
 540
 543
 546
 549
 552
 555
 558
 561
 564
 567
 570
 573
 576
 579
 582
 585
 588
 591
 594
 597
 600
 603
 606
 609
 612
 615
 618
 621
 624
 627
 630
 633
 636
 639
 642
 645
 648
 651
 654
 657
 660
 663
 666
 669
 672
 675
 678
 681
 684
 687
 690
 693
 696
 699
 702
 705
 708
 711
 714
 717
 720
 723
 726
 729
 732
 735
 738
 741
 744
 747
 750
 753
 756
 759
 762
 765
 768
 771
 774
 777
 780
 783
 786
 789
 792
 795
 798
 801
 804
 807
 810
 813
 816
 819
 822
 825
 828
 831
 834
 837
 840
 843
 846
 849
 852
 855
 858
 861
 864
 867
 870
 873
 876
 879
 882
 885
 888
 891
 894
 897
 900
 903
 906
 909
 912
 915
 918
 921
 924
 927
 930
 933
 936
 939
 942
 945
 948
 951
 954
 957
 960
 963
 966
 969
 972
 975
 978
 981
 984
 987
 990
 993
 996
 999

(I I) その2

【0013】さらに、本発明は、細胞内で複製可能なベクターの発現制御シグナルの下流に上記ヌクレオチド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA分子を組み
 30
 込んだ形態のベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養して当該酵素を生産させた好熱菌由来のヌクレオチド・ホスホリラーゼを保持する微生物菌体を含有する培養物、および該培養物から分離した好熱菌由来のヌクレオチド・ホスホリラーゼを保持する微生物菌体もしくはその延伸物に関するものである。

【0014】さらにまた、本発明は、塩基供与体、糖残基供与体及びリン酸供与体をヌクレオチド・ホスホリラーゼを含有する酵素調製物を用いて反応させ、塩基供与体の塩基部分と糖残基供与体の糖部分との間にヌーグリン
 40
 コシド結合を形成させてヌクレオチドを製造する方法において、ヌクレオチド・ホスホリラーゼを含有する酵素調製物として上記培養物または上記微生物菌体もしくはその延伸物を使用することを特徴とするヌクレオチドの製造法に関するものである。

【0015】以下、本発明について詳述する。なお、本明細書における以下の用語は下記の定義で用いられている。「パシラス属に属する好熱菌由来」とは、DNA分子の塩基配列がパシラス属に属する好熱菌の遺伝子のそれと実質的に同じであるということの意味するものであ
 50

って、必ずしも本発明によるDNA断片がパシラス属に属する好熱菌から抽出されたものに限定されることを意味するものではない。「塩基配列が実質的に同じ」とは、ヌクレオチド・ホスホリラーゼとしての遺伝情報が維持されている限り、いくつかの単位ヌクレオチド（塩基）の置換、欠失及び/または付加があってもよいことを意味する。

【0016】1.ヌクレオチド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA分子

本発明におけるパシラス属に属する好熱菌由来のヌクレオチド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA分子とは、上記式(1)および/または式(1.1)の塩基配列をコードするヌクレオチド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するものであり、その具体的な塩基配列は特に限定されるものではない。たとえば、図1に示す好熱菌遺伝子は規定されるDNA分子、より具体的に、ポリヌクレオチド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA分子としてはN₁とR₁とR₂とR₃とR₄とR₅とR₆とR₇とR₈とR₉とR₁₀とR₁₁とR₁₂とR₁₃とR₁₄とR₁₅とR₁₆とR₁₇とR₁₈とR₁₉とR₂₀とR₂₁とR₂₂とR₂₃とR₂₄とR₂₅とR₂₆とR₂₇とR₂₈とR₂₉とR₃₀とR₃₁とR₃₂とR₃₃とR₃₄とR₃₅とR₃₆とR₃₇とR₃₈とR₃₉とR₄₀とR₄₁とR₄₂とR₄₃とR₄₄とR₄₅とR₄₆とR₄₇とR₄₈とR₄₉とR₅₀とR₅₁とR₅₂とR₅₃とR₅₄とR₅₅とR₅₆とR₅₇とR₅₈とR₅₉とR₆₀とR₆₁とR₆₂とR₆₃とR₆₄とR₆₅とR₆₆とR₆₇とR₆₈とR₆₉とR₇₀とR₇₁とR₇₂とR₇₃とR₇₄とR₇₅とR₇₆とR₇₇とR₇₈とR₇₉とR₈₀とR₈₁とR₈₂とR₈₃とR₈₄とR₈₅とR₈₆とR₈₇とR₈₈とR₈₉とR₉₀とR₉₁とR₉₂とR₉₃とR₉₄とR₉₅とR₉₆とR₉₇とR₉₈とR₉₉とR₁₀₀とR₁₀₁とR₁₀₂とR₁₀₃とR₁₀₄とR₁₀₅とR₁₀₆とR₁₀₇とR₁₀₈とR₁₀₉とR₁₁₀とR₁₁₁とR₁₁₂とR₁₁₃とR₁₁₄とR₁₁₅とR₁₁₆とR₁₁₇とR₁₁₈とR₁₁₉とR₁₂₀とR₁₂₁とR₁₂₂とR₁₂₃とR₁₂₄とR₁₂₅とR₁₂₆とR₁₂₇とR₁₂₈とR₁₂₉とR₁₃₀とR₁₃₁とR₁₃₂とR₁₃₃とR₁₃₄とR₁₃₅とR₁₃₆とR₁₃₇とR₁₃₈とR₁₃₉とR₁₄₀とR₁₄₁とR₁₄₂とR₁₄₃とR₁₄₄とR₁₄₅とR₁₄₆とR₁₄₇とR₁₄₈とR₁₄₉とR₁₅₀とR₁₅₁とR₁₅₂とR₁₅₃とR₁₅₄とR₁₅₅とR₁₅₆とR₁₅₇とR₁₅₈とR₁₅₉とR₁₆₀とR₁₆₁とR₁₆₂とR₁₆₃とR₁₆₄とR₁₆₅とR₁₆₆とR₁₆₇とR₁₆₈とR₁₆₉とR₁₇₀とR₁₇₁とR₁₇₂とR₁₇₃とR₁₇₄とR₁₇₅とR₁₇₆とR₁₇₇とR₁₇₈とR₁₇₉とR₁₈₀とR₁₈₁とR₁₈₂とR₁₈₃とR₁₈₄とR₁₈₅とR₁₈₆とR₁₈₇とR₁₈₈とR₁₈₉とR₁₉₀とR₁₉₁とR₁₉₂とR₁₉₃とR₁₉₄とR₁₉₅とR₁₉₆とR₁₉₇とR₁₉₈とR₁₉₉とR₂₀₀とR₂₀₁とR₂₀₂とR₂₀₃とR₂₀₄とR₂₀₅とR₂₀₆とR₂₀₇とR₂₀₈とR₂₀₉とR₂₁₀とR₂₁₁とR₂₁₂とR₂₁₃とR₂₁₄とR₂₁₅とR₂₁₆とR₂₁₇とR₂₁₈とR₂₁₉とR₂₂₀とR₂₂₁とR₂₂₂とR₂₂₃とR₂₂₄とR₂₂₅とR₂₂₆とR₂₂₇とR₂₂₈とR₂₂₉とR₂₃₀とR₂₃₁とR₂₃₂とR₂₃₃とR₂₃₄とR₂₃₅とR₂₃₆とR₂₃₇とR₂₃₈とR₂₃₉とR₂₄₀とR₂₄₁とR₂₄₂とR₂₄₃とR₂₄₄とR₂₄₅とR₂₄₆とR₂₄₇とR₂₄₈とR₂₄₉とR₂₅₀とR₂₅₁とR₂₅₂とR₂₅₃とR₂₅₄とR₂₅₅とR₂₅₆とR₂₅₇とR₂₅₈とR₂₅₉とR₂₆₀とR₂₆₁とR₂₆₂とR₂₆₃とR₂₆₄とR₂₆₅とR₂₆₆とR₂₆₇とR₂₆₈とR₂₆₉とR₂₇₀とR₂₇₁とR₂₇₂とR₂₇₃とR₂₇₄とR₂₇₅とR₂₇₆とR₂₇₇とR₂₇₈とR₂₇₉とR₂₈₀とR₂₈₁とR₂₈₂とR₂₈₃とR₂₈₄とR₂₈₅とR₂₈₆とR₂₈₇とR₂₈₈とR₂₈₉とR₂₉₀とR₂₉₁とR₂₉₂とR₂₉₃とR₂₉₄とR₂₉₅とR₂₉₆とR₂₉₇とR₂₉₈とR₂₉₉とR₃₀₀とR₃₀₁とR₃₀₂とR₃₀₃とR₃₀₄とR₃₀₅とR₃₀₆とR₃₀₇とR₃₀₈とR₃₀₉とR₃₁₀とR₃₁₁とR₃₁₂とR₃₁₃とR₃₁₄とR₃₁₅とR₃₁₆とR₃₁₇とR₃₁₈とR₃₁₉とR₃₂₀とR₃₂₁とR₃₂₂とR₃₂₃とR₃₂₄とR₃₂₅とR₃₂₆とR₃₂₇とR₃₂₈とR₃₂₉とR₃₃₀とR₃₃₁とR₃₃₂とR₃₃₃とR₃₃₄とR₃₃₅とR₃₃₆とR₃₃₇とR₃₃₈とR₃₃₉とR₃₄₀とR₃₄₁とR₃₄₂とR₃₄₃とR₃₄₄とR₃₄₅とR₃₄₆とR₃₄₇とR₃₄₈とR₃₄₉とR₃₅₀とR₃₅₁とR₃₅₂とR₃₅₃とR₃₅₄とR₃₅₅とR₃₅₆とR₃₅₇とR₃₅₈とR₃₅₉とR₃₆₀とR₃₆₁とR₃₆₂とR₃₆₃とR₃₆₄とR₃₆₅とR₃₆₆とR₃₆₇とR₃₆₈とR₃₆₉とR₃₇₀とR₃₇₁とR₃₇₂とR₃₇₃とR₃₇₄とR₃₇₅とR₃₇₆とR₃₇₇とR₃₇₈とR₃₇₉とR₃₈₀とR₃₈₁とR₃₈₂とR₃₈₃とR₃₈₄とR₃₈₅とR₃₈₆とR₃₈₇とR₃₈₈とR₃₈₉とR₃₉₀とR₃₉₁とR₃₉₂とR₃₉₃とR₃₉₄とR₃₉₅とR₃₉₆とR₃₉₇とR₃₉₈とR₃₉₉とR₄₀₀とR₄₀₁とR₄₀₂とR₄₀₃とR₄₀₄とR₄₀₅とR₄₀₆とR₄₀₇とR₄₀₈とR₄₀₉とR₄₁₀とR₄₁₁とR₄₁₂とR₄₁₃とR₄₁₄とR₄₁₅とR₄₁₆とR₄₁₇とR₄₁₈とR₄₁₉とR₄₂₀とR₄₂₁とR₄₂₂とR₄₂₃とR₄₂₄とR₄₂₅とR₄₂₆とR₄₂₇とR₄₂₈とR₄₂₉とR₄₃₀とR₄₃₁とR₄₃₂とR₄₃₃とR₄₃₄とR₄₃₅とR₄₃₆とR₄₃₇とR₄₃₈とR₄₃₉とR₄₄₀とR₄₄₁とR₄₄₂とR₄₄₃とR₄₄₄とR₄₄₅とR₄₄₆とR₄₄₇とR₄₄₈とR₄₄₉とR₄₅₀とR₄₅₁とR₄₅₂とR₄₅₃とR₄₅₄とR₄₅₅とR₄₅₆とR₄₅₇とR₄₅₈とR₄₅₉とR₄₆₀とR₄₆₁とR₄₆₂とR₄₆₃とR₄₆₄とR₄₆₅とR₄₆₆とR₄₆₇とR₄₆₈とR₄₆₉とR₄₇₀とR₄₇₁とR₄₇₂とR₄₇₃とR₄₇₄とR₄₇₅とR₄₇₆とR₄₇₇とR₄₇₈とR₄₇₉とR₄₈₀とR₄₈₁とR₄₈₂とR₄₈₃とR₄₈₄とR₄₈₅とR₄₈₆とR₄₈₇とR₄₈₈とR₄₈₉とR₄₉₀とR₄₉₁とR₄₉₂とR₄₉₃とR₄₉₄とR₄₉₅とR₄₉₆とR₄₉₇とR₄₉₈とR₄₉₉とR₅₀₀とR₅₀₁とR₅₀₂とR₅₀₃とR₅₀₄とR₅₀₅とR₅₀₆とR₅₀₇とR₅₀₈とR₅₀₉とR₅₁₀とR₅₁₁とR₅₁₂とR₅₁₃とR₅₁₄とR₅₁₅とR₅₁₆とR₅₁₇とR₅₁₈とR₅₁₉とR₅₂₀とR₅₂₁とR₅₂₂とR₅₂₃とR₅₂₄とR₅₂₅とR₅₂₆とR₅₂₇とR₅₂₈とR₅₂₉とR₅₃₀とR₅₃₁とR₅₃₂とR₅₃₃とR₅₃₄とR₅₃₅とR₅₃₆とR₅₃₇とR₅₃₈とR₅₃₉とR₅₄₀とR₅₄₁とR₅₄₂とR₅₄₃とR₅₄₄とR₅₄₅とR₅₄₆とR₅₄₇とR₅₄₈とR₅₄₉とR₅₅₀とR₅₅₁とR₅₅₂とR₅₅₃とR₅₅₄とR₅₅₅とR₅₅₆とR₅₅₇とR₅₅₈とR₅₅₉とR₅₆₀とR₅₆₁とR₅₆₂とR₅₆₃とR₅₆₄とR₅₆₅とR₅₆₆とR₅₆₇とR₅₆₈とR₅₆₉とR₅₇₀とR₅₇₁とR₅₇₂とR₅₇₃とR₅₇₄とR₅₇₅とR₅₇₆とR₅₇₇とR₅₇₈とR₅₇₉とR₅₈₀とR₅₈₁とR₅₈₂とR₅₈₃とR₅₈₄とR₅₈₅とR₅₈₆とR₅₈₇とR₅₈₈とR₅₈₉とR₅₉₀とR₅₉₁とR₅₉₂とR₅₉₃とR₅₉₄とR₅₉₅とR₅₉₆とR₅₉₇とR₅₉₈とR₅₉₉とR₆₀₀とR₆₀₁とR₆₀₂とR₆₀₃とR₆₀₄とR₆₀₅とR₆₀₆とR₆₀₇とR₆₀₈とR₆₀₉とR₆₁₀とR₆₁₁とR₆₁₂とR₆₁₃とR₆₁₄とR₆₁₅とR₆₁₆とR₆₁₇とR₆₁₈とR₆₁₉とR₆₂₀とR₆₂₁とR₆₂₂とR₆₂₃とR₆₂₄とR₆₂₅とR₆₂₆とR₆₂₇とR₆₂₈とR₆₂₉とR₆₃₀とR₆₃₁とR₆₃₂とR₆₃₃とR₆₃₄とR₆₃₅とR₆₃₆とR₆₃₇とR₆₃₈とR₆₃₉とR₆₄₀とR₆₄₁とR₆₄₂とR₆₄₃とR₆₄₄とR₆₄₅とR₆₄₆とR₆₄₇とR₆₄₈とR₆₄₉とR₆₅₀とR₆₅₁とR₆₅₂とR₆₅₃とR₆₅₄とR₆₅₅とR₆₅₆とR₆₅₇とR₆₅₈とR₆₅₉とR₆₆₀とR₆₆₁とR₆₆₂とR₆₆₃とR₆₆₄とR₆₆₅とR₆₆₆とR₆₆₇とR₆₆₈とR₆₆₉とR₆₇₀とR₆₇₁とR₆₇₂とR₆₇₃とR₆₇₄とR₆₇₅とR₆₇₆とR₆₇₇とR₆₇₈とR₆₇₉とR₆₈₀とR₆₈₁とR₆₈₂とR₆₈₃とR₆₈₄とR₆₈₅とR₆₈₆とR₆₈₇とR₆₈₈とR₆₈₉とR₆₉₀とR₆₉₁とR₆₉₂とR₆₉₃とR₆₉₄とR₆₉₅とR₆₉₆とR₆₉₇とR₆₉₈とR₆₉₉とR₇₀₀とR₇₀₁とR₇₀₂とR₇₀₃とR₇₀₄とR₇₀₅とR₇₀₆とR₇₀₇とR₇₀₈とR₇₀₉とR₇₁₀とR₇₁₁とR₇₁₂とR₇₁₃とR₇₁₄とR₇₁₅とR₇₁₆とR₇₁₇とR₇₁₈とR₇₁₉とR₇₂₀とR₇₂₁とR₇₂₂とR₇₂₃とR₇₂₄とR₇₂₅とR₇₂₆とR₇₂₇とR₇₂₈とR₇₂₉とR₇₃₀とR₇₃₁とR₇₃₂とR₇₃₃とR₇₃₄とR₇₃₅とR₇₃₆とR₇₃₇とR₇₃₈とR₇₃₉とR₇₄₀とR₇₄₁とR₇₄₂とR₇₄₃とR₇₄₄とR₇₄₅とR₇₄₆とR₇₄₇とR₇₄₈とR₇₄₉とR₇₅₀とR₇₅₁とR₇₅₂とR₇₅₃とR₇₅₄とR₇₅₅とR₇₅₆とR₇₅₇とR₇₅₈とR₇₅₉とR₇₆₀とR₇₆₁とR₇₆₂とR₇₆₃とR₇₆₄とR₇₆₅とR₇₆₆とR₇₆₇とR₇₆₈とR₇₆₉とR₇₇₀とR₇₇₁とR₇₇₂とR₇₇₃とR₇₇₄とR₇₇₅とR₇₇₆とR₇₇₇とR₇₇₈とR₇₇₉とR₇₈₀とR₇₈₁とR₇₈₂とR₇₈₃とR₇₈₄とR₇₈₅とR₇₈₆とR₇₈₇とR₇₈₈とR₇₈₉とR₇₉₀とR₇₉₁とR₇₉₂とR₇₉₃とR₇₉₄とR₇₉₅とR₇₉₆とR₇₉₇とR₇₉₈とR₇₉₉とR₈₀₀とR₈₀₁とR₈₀₂とR₈₀₃とR₈₀₄とR₈₀₅とR₈₀₆とR₈₀₇とR₈₀₈とR₈₀₉とR₈₁₀とR₈₁₁とR₈₁₂とR₈₁₃とR₈₁₄とR₈₁₅とR₈₁₆とR₈₁₇とR₈₁₈とR₈₁₉とR₈₂₀とR₈₂₁とR₈₂₂とR₈₂₃とR₈₂₄とR₈₂₅とR₈₂₆とR₈₂₇とR₈₂₈とR₈₂₉とR₈₃₀とR₈₃₁とR₈₃₂とR₈₃₃とR₈₃₄とR₈₃₅とR₈₃₆とR₈₃₇とR₈₃₈とR₈₃₉とR₈₄₀とR₈₄₁とR₈₄₂とR₈₄₃とR₈₄₄

ることができる。

【0017】このようなDNA分子は、ヌクレオシド・ホスホリラーゼの構造遺伝子の他に少なくとも構造遺伝子の5'上流にSD配列を含有するものであり、構造遺伝子のみを含有するDNA分子を使用した時と比較してヌクレオシド・ホスホリラーゼの生産量を著しく増加させることができる点で、本発明の目的にかなうものである。従って、本発明方法においては、図2〜4に示す塩基配列中の少なくともSD配列から終止コードまでの塩基配列を含有するDNA分子を使用することが好ましい。なお、ポリヌクレオシド・ホスホリラーゼおよびピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼの両酵素を生産させる場合には、そのDNA分子中の構造遺伝子の5'上流にSD配列が少なくとも一つ存在するものを使用すればよい。

【0018】なお、図1における「pnaA」はポリヌクレオシド・ホスホリラーゼをコードする遺伝子(832 bp, 271個のアミノ酸からなる分子量91,628のポリペプチドをコードする)、「psyA」はピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼをコードする遺伝子(1298 bp, 433個のアミノ酸からなる分子量46,271のポリペプチドをコードする)を示す。本発明者らによる解析では、両遺伝子はクラスターをなしており、それぞれその翻訳開始に必要なリボソーム結合部位を有しているが、その近傍の5'上流に好熱菌のプロモーター構造及び大腸菌で機能できるようなプロモーター構造を有していない。

【0019】このようなDNA分子は、先の山内の方法(特開平4-4882号公報)などのように高温でのヌクレオシド分解活性を指標としてバシラス属に属する好熱菌からクローン化することができる。あるいは通常よく行われるように、バシラス属に属する好熱菌由来の精製したヌクレオシド・ホスホリラーゼのアミノ末端などの一部アミノ酸配列を既知の方法で決定し、もしくは上記式(1)および/または式(1')のアミノ酸配列の一部の配列を参考にし、それに相当するオリゴヌクレオチドを合成し、該オリゴヌクレオチドをプローブとしてバシラス属に属する好熱菌の遺伝子バンクよりヌクレオシド・ホスホリラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を選出する方法も採用できる。クローン化に用いる宿主は特に限定されないが、操作性及び簡便性から大腸菌を宿主とするのが適当である。さらに、図2〜4を参照して通常のDNA合成機を用いて化学的に合成してもかまわない。

【0020】通常、プラスミドベクターなどにはこれらの断片をクローン化しても、該DNA断片はプロモーターを有していないか、あるいはプロモーターを有していても異種微生物内で効率的に機能できないことが多い。コードされた遺伝子の高発現は通常起こらないとされている。また、コーディング領域以外の余分なDNAを有していると、たとえばプラスミドベクター上に存在している

他の遺伝子のプロモーターからのリードスルー(read through)転写によっても、その発現が起こることがあり、好ましいことではない。このため、目的とする遺伝子の高発現を具現化するためには、クローン化したDNA断片の塩基配列を解析し、該遺伝子のコーディング領域を特定し、宿主微生物に応じて該遺伝子が微生物菌体中で高発現可能となるように発現制御シグナル(転写開始及び翻訳開始シグナル)をその5'上流に連結した組換え発現ベクターを作製する必要がある。DNA塩基配列の決定は、常法により行うことができ、たとえばキザム・ギルハートの方法(Methods in Enzymology, 65, 449(1980))もしくはダイデオキシシチンエーミネーター法(Methods in Enzymology, 101, 20(1983))などを応用して行うことができる。

【0021】B. 組換えベクター

ヌクレオシド・ホスホリラーゼ遺伝子を異種微生物内で大量発現させるために使用する発現制御シグナルとしては、人為的制御が可能で、ヌクレオシド・ホスホリラーゼ遺伝子の発現量を飛躍的に上昇させるような強力な転写開始並びに翻訳開始シグナルを用いることが望ましい。このような転写開始シグナルとしては、宿主として大腸菌を用いる場合には、lacプロモーター、trpプロモーター、tacプロモーター(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 21(1983), Gene, 20, 231(1982)), trcプロモーター(J. Biol. Chem., 260, 3-39(1985))などを、酵母を宿主とする場合にはグリセラルデヒド-3-オスフェート・デヒドロゲナーゼ(J. Biol. Chem., 254, 2078(1980))や抑制性酸性ホスファターゼ(Nucl. Acids Res., 11, 1657(1983))などの遺伝子の発現制御シグナルを例示することができる。

【0022】ベクターとしては、種々のプラスミドベクター、ファージベクターなどが使用可能であるが、微生物菌体内で複製可能であり、適当な薬剤耐性マーカーと特定の制限酵素切断部位を有し、菌体内のコピー数の高いプラスミドベクターを使用するのが望ましい。具体的に大腸菌を宿主とする場合には、pBR322(Gene, 2, 95(1975)), pUC18, pUC19(Gene, 33, 103(1985))などを例示することができる。また、酵母を宿主とする場合には、YEpl3(ATCC 37115), YEpl24(ATCC3761)などを例示することができる。ヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の調製、クローニングした遺伝子と発現制御シグナルとの連結などの方法は、一般の技術者、特に分子生物学、遺伝子工学の分野に属する技術者にとっては周知の技術であり、具体的には、例えば「Molecular Cloning」(Maniatisら編, Cold Spring Harbor, New York(1982))に記載の方法に従って行うことができる。

【0023】3. 形質転換体の作製と培養

作製した組換えベクターを用いて微生物を形質転換する。宿主となる微生物としては安全性が高く取扱いやす

いものであれば特に限定されない。例えば、大腸菌、酵母などの微生物を宿主として用いることができる。その中でも、大腸菌が取扱いし、及びスケレオシドアナログの合成上有利であり、例えば細胞融合の実験に使用される K12株、C600株、JM105株、JM109株などが使用可能である。微生物を形質転換する方法はすでに多くの方法が報告されており、宿主として使用する微生物に依りて適宜選択されたい。例えば大腸菌を宿主として使用する場合は、低温下、塩化ナトリウム処理して菌体内にプラスミドを導入する方法（J. Mol. Biol. 132, 139-147）、または大腸菌を用形質転換することができる。また、酵母を宿主とする場合には、プロトプラズム法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1909-1913）、あるいはアルカリ金属処理法（J. Bacteriol. 153, 163 (1983)）などの方法を採用することができる。

【0024】得られた形質転換体は、当該微生物が増殖可能な培地中で増殖させ、さらにクロニ化したスケレオシド・ホスホリラーゼ遺伝子の発現を誘導して菌体内に該酵素が大量に蓄積するまで培養を行う。形質転換体の培養は、炭素源、窒素源などの当該微生物の増殖に必要な栄養源を含有する培地を用いて常法に従って行えばよい。例えば、大腸菌を宿主として使用する場合は、培地として 2 x YT 培地（Methods in Enzymology, 100-20(1983)）、LB 培地、M9 培地（Molecular Cloning、前述）などの大腸菌の培養に常用されている培地を用い、20〜40℃の培養温度で必要により通気、攪拌しながら培養することができる。また、ベクターとしてプラスミドを用いた場合には、培養中におけるプラスミドの脱落を防ぐために適当な抗生物質（プラスミドの薬剤耐性マーカーに応じ、アンピシリン・テトラサイクリンなど）の薬剤を適量培養液に加えて培養する。

【0025】培養中にスケレオシド・ホスホリラーゼ遺伝子の発現を誘導する必要がある場合には、用いたベクターで常用されている方法で該遺伝子の発現を誘導する。例えば、lac プロモーターや tac プロモーターを使用した場合には、培養中期に発現誘導剤であるイソプロピル β-D-チオガラクトピラニド（以下、IPTG と略称する）を適量添加する。また、使用するプロモーターが構成的に転写活性を有する場合には、特に発現誘導剤を添加する必要はない。スケレオシド・ホスホリラーゼ遺伝子の発現を誘導した後、該遺伝子産物を菌体内に大量蓄積させるため、さらに数時間培養を継続して酵素液としての培養物を得る。得られた培養物は、スケレオシドアナログ合成の酵素源として使用できる。

【0026】4. 培養菌体及びその処理物
培養菌体は、培養後固形分離あるいは遠心分離処理などによりその菌体を回収する。培養菌体そのものを酵素源として使用する場合は、回収菌体を適当な緩衝液に懸濁して直接スケレオシドアナログの合成に使用できる。また、

酵素液、あるいは、スケレオシドアナログ合成を行うためには、回収菌体より生産されたスケレオシド・ホスホリラーゼを精製すればよい。例えば、回収した菌体を適当な緩衝液に懸濁し、超音波処理、フレンチプレス処理などにより物理的に菌体を破砕する。あるいは、フレンチ処理など酵素的に溶菌させ、菌体残渣を遠心分離により除去して無細胞抽出液を調製する。無細胞抽出液内に該酵素は溶解に存在しているため、無細胞抽出液そのものを酵素源として使用することができる。さらに精製が必要とされる場合でも、熱処理、硫酸塩析処理、透析処理、エタノールなどの溶媒処理、各種カラムクロマトグラフィー処理などの酵素精製に通常使用されている処理を単独で、またはこれら2種類の処理を組み合わせたものを簡便な手段でスケレオシドアナログ合成に好適な高濃度に精製された酵素源を調製できる。なお、大腸菌を宿主微生物とする場合は、無細胞抽出液を熱処理（60〜80℃で1〜10分）するとほとんど大腸菌由来蛋白質が変性し、遠心分離操作により簡単に除去でき、非常に効率的な酵素の精製が可能である。

【0027】5. スケレオシド・アナログの合成
本発明のスケレオシド・アナログの合成は、上記の培養物または上記の培養菌体もしくはその処理物を使用することを特徴とするものであり、その他の条件方法は公知の方法（たとえば、国際特許公開 WO 90/10080 号参照）に準じて行えばよい。すなわち、使用する酵素の最適条件を予備試験により設定し、この条件下で原料化合物と培養物または培養菌体もしくはその処理物とを反応させることにより実施することができる。さらに具体的には、反応温度としては 30〜95℃、反応時間としては 3〜10 日から適宜至適条件を選択し、適量の無機リン酸を含有する適当な緩衝液に糖基基体としてスケレオシド及び塩基供与体として塩基アナログなどを添加し、設定条件下で反応させることにより行うことができる。反応終了後、合成されたスケレオシドアナログは核酸関連物質の精製法として通常使用されている方法を適宜組み合わせで精製精製することができる。

【0028】

【発明の効果】本発明により前記した従来の問題点が解決され、バシラス属に属する好熱菌由来のスケレオシド・ホスホリラーゼを用いた効率的なスケレオシドアナログ合成が可能となった。すなわち、本発明は下記の利点を与える。

（1）微生物菌体を酵素源とした、副反応の少ない効率的なスケレオシドアナログ合成が可能となる。バシラス属に属する好熱菌菌体を酵素源としてスケレオシドアナログを合成する場合、スケレオシド・ホスホリラーゼ以外の基質あるいは生成物分解酵素も耐熱性を有するため、高温での反応でも副反応が進行する。しかしながら例えば、宿主微生物として大腸菌を用いて高温で合成反応を行えば、大腸菌由来の酵素はそのほとんどが失活

し、副反応はほとんど生じない。また、大腸菌などを宿主微生物とすれば、従来の自己溶菌の問題は解決される。さらに、組換え菌においては好熱菌由来ヌクレオシド・ホスホリラーゼが大量生産されているため、合成反応に使用する菌体量は少量で充分であり、経済的にも効率的なヌクレオシドアナログ合成が可能となる。

【0029】(10) 酵素大量調製が簡便となり、酵素的ヌクレオシドアナログ合成の実用化が可能となる。従来のバクテリウス属に属する好熱菌からのヌクレオシド・ホスホリラーゼの調製は極めて困難であったが、組換えDNA手法により該酵素を大量生産させることで、その大量調製は極めて簡便となる。例えば、大腸菌を宿主微生物とすれば、リゾチーム処理あるいは超音波処理などの簡便な操作で高収率で該酵素を抽出できる。また該酵素は耐熱性を有することから、熱処理を施すことで、副反応に関与する大腸菌酵素を失活除去させることが可能であり、簡便な操作で比活性の高い酵素標品を調製することも可能である。プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ及びピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ両酵素を用いてヌクレオシドアナログを合成する場合、どちらかの酵素が関与する反応が律速となり、効率的な反応が生じない現象がある。しかし、好熱菌からは一定の比率でしかプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼとピリミジンヌクレオシドホスホリラーゼが調製されず、その比率を変えることは極めて困難であった。しかしながら、両酵素を組換えDNA手法で別々に生産することにより、その比率を改変して効率的なヌクレオシドアナログ合成を行うことも可能となる。このように、本発明はヌクレオシドアナログの効率的な製造を実用化するものであり、産業上きわめて有益なものである。

【0030】

【実施例】以下、*Bacillus stearothermophilus* TH6-2株(微工研寄第2758号)由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼに関して実施例をあげ、具体的に説明する。また、本実施例におけるDNAの調製、制限酵素による切断、T4 DNAリガーゼによるDNA連結、並びに大腸菌の形質転換法は全て「Molecular Cloning」(前述)に従って行った。また、各種制限酵素、T4 DNAリガーゼ、プラスミドベクター pUC118及びpUC119、pPstI リンカー並びにキロシュークエンス用デレーションキットは全て宝酒造(株)より入手した。

【0031】実施例1 好熱菌ヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA分子のDNA塩基配列の決定

先に山内らにより調製された好熱菌*Bacillus stearothermophilus* TH6-2株由来のプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼとピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼをコードする遺伝子を含有する4.6 kbのDNA断片(図1参照、特開平4-14882、この断片が挿入されたpUC119プラスミドを保持する大腸菌K12株エシェリシア・コ

リKY-2は平成2年1月1日に工業技術院微生物工業技術研究所に寄託され、微工研菌寄第11197号の受託番号を受けている)よりプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有すると思われる、2.4 kbのSacI-EcoRV DNA断片をpUC118及びpUC119にサブクローニングした。該組換えプラスミドをキロシュークエンス用デレーションキットを用いて、文献(Gene, 28, 351 (1984))の方法に従って当該挿入部分の一部が脱落し、異なる鎖長を持った種々のクローンを作製した。得られた種々のクローンの挿入断片について、ダイデオキシジエチルターミナーター法(Science, 214, 1295 (1981))によりDNA塩基配列を決定した。その結果、図2に示すプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子のDNA配列を得た。この塩基配列は、822 bpであり、Metで始まる271個のアミノ酸からなる分子量29,637のポリペプチドをコードする。なお、このペプチドのアミノ末端20個のアミノ酸配列は、精製単離した好熱菌プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼのそれと完全に一致した。

【0032】次に、ピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有すると思われる2.8 kbのPstI-EcoRI DNA断片に関しては、pUC118及びpUC119に各種制限酵素を用いてショットガンサブクローニングを行い、先と同様ダイデオキシジエチルターミナーター法でその塩基配列を決定した。その結果、図3および4に示すピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を得た。この塩基配列は、1,298 bpであり、433個のアミノ酸からなる分子量46,271のポリペプチドをコードする。なお、このペプチドのアミノ末端10個のアミノ酸配列は、精製単離した好熱菌ピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼのそれと完全に一致した。

【0033】実施例2 好熱菌ヌクレオシド・ホスホリラーゼ高発現用組換えベクターの作製

プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ生産用組換えベクター-pTrec-punaを以下の方法で作製した(図5参照)。すなわち、プラスミドベクター-pTrec99A(Gene, 66, 301 (1988)、Pharmacia 社より入手)を制限酵素 NcoI及びSmaIで切断後、プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子及びSD配列を含有するNcoI-HpaI DNA断片を上記プラスミドベクター-pTrec99Aの切断断片とをT4 DNAリガーゼを用いて連結し、該連結反応液を用いて大腸菌 JM105株を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換体より、pTrec99Aの発現用Trecプロモーターの直後にSD配列及びプリンヌクレオシドホスホリラーゼ構造遺伝子が挿入された組換えベクター-pTrec-punaを得た。

【0034】次に、ピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ高発現用組換えベクター-pTrec-pvnを作製した(図6参照)。すなわち、先の4.6 kbのDNA断片を制限酵素EincIIで部分分解し、さらにその生成物にT4 DN

【0034】ゲを用いてpBS11と1-3を連結した反応生成物は、さらに制限酵素PstIで切断し、 λ ベクトルにライゲーションを行う。ライゲーション後、構造遺伝子及びそのS/D配列を含有する2.2 kbのPstI-DNA断片を調製した。このDNA断片を制限酵素PstIで切断したpTrec99Aを7.1 U、NAD⁺、ガーゼを用いて連結反応を行い、さらに該反応液を用いて大腸菌JM105株を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換体より、pTrec99Aのtrecプロモーター直後のPstI切断部位にスクレオシド・ホスホリラーゼ及びピリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼの転移方向と一致して挿入された組換えベクターpTrec-pynを得た。

【0035】さらに、好熱菌*Bacillus stearothermophilus*のスクレオシド・ホスホリラーゼ及びピリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼ肉酵素生産用ベクターpTrec-NBを作製した(図7参照)。すなわち、約4.6 kbのDNA断片より肉酵素構造遺伝子及びそれぞれのS/D配列を含有するNeol-EcoRI-DNA断片を制限酵素NcoI及びEcoRIで切断したpTrec99Aを7.1 U、NAD⁺、ガーゼを用いて連結し、その連結反応液を用いて大腸菌JM105株を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換体より、pTrec99Aのtrecプロモーター直後のNcoI-EcoRI切断部位にプリンスクレオシド・ホスホリラーゼ及びピリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼのS/D配列及び構造遺伝子が挿入された組換えベクターpTrec-NBを得た。

【0036】実施例3: 形質転換体の培養、酵素抽出
上記の3種類の組換えベクターを保持する大腸菌形質転換体を、1.5 Lの50 mMアンピシリンを含有するLX中で培養し、0.0 mlに菌濃度を3.7 $\times 10^8$ 個/mlに達した時点で、培養液に終濃度10 mMとなるように1.0 M NaClを加え、さらに20分間の時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離(2,000 g、10分間)により培養菌体を回収し、20 mlの緩衝液(50 mM Tris-HCl、pH 7.5、0.1 mM EDTA、0.1% Triton X-100)に懸濁した。菌体懸濁液に終濃度1 mg/mlとなるように、10 mM NaClを加え、37℃で1時間保温することにより菌体を溶解させ、さらに遠心分離(2,000 g、10分間)により菌体残渣を除去した。このようにして得られた清液分を菌体抽出液とした。菌体抽出液におけるスクレオシド・ホスホリラーゼ活性を対照菌pTrec99Aを保持する大腸菌JM105、及びpUC119-PYRE(特開平4-4882)を含有する大腸菌JM105と共に下記表に示す。なお、プリンスクレオシド・ホスホリラーゼ及びピリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼ活性は、山内の方法(特開平4-4882)に従い、7.0分におけるそれぞれイソシン及びウリジンの加水分解活性を測定して算出した。

【0037】

【表1】

菌株/ベクター	スクレオシド分解活性 (units/mg protein)	ピリミジン分解活性 (units/mg protein)**
JM105/pTrec99A	0.9	1.1
JM105/pUC119-PYRE	17.1	11.6
JM105/pTrec-pyn	134.9	測定せず
JM105/pTrec-pyn	測定せず	100.3
JM105/pTrec-NB	134.7	68.0

*1 unit = 1 μ mol of Hypoxanthine production/min at 70°C

**1 unit = 1 μ mol of Uridine production/min at 70°C

【0038】表1に示すように、作製した組換えベクターを保持する形質転換体においては、対照菌pTrec99Aを保持する大腸菌JM105の1.0倍以上の高温で活性を有するスクレオシド・ホスホリラーゼ活性が確認された。また、本発明で造成された形質転換体pTrec-NB(保持菌は、従来法(特開平1-1582)で造成された形質転換体pUC119-PYRE保持菌)の6~8倍のスクレオ

シド・ホスホリラーゼを生産することも確認された。また、この形質転換体の生産性は元株である好熱菌*Bacillus stearothermophilus* HB-2株の約8倍に相当する。なお、これら組換えベクターを保持する大腸菌形質転換体より調製されたスクレオシド・ホスホリラーゼは、好熱菌由来の酵素と同等の性質を有していた。

【0039】実施例4: 培養菌体を用いたスクレオシド

アナログ(リバピリン)の合成

実施例3と同様の方法で得られたpTrc-NEを保持する大腸菌 JM109株の培養液1.0 mlより遠心分離により培養菌体を回収し、1 mlの生理食塩水に懸濁した。この菌体懸濁液に塩基供与体として4.0 mMの1, 2, 4-トリアゾール-3-カルボキサミド(以下、「トリアゾール」と略称する)、また糖残基供与体として6.0 mMのウリジンを含む1.0 mMリン酸緩衝液(pH 6.0-9.0)を添加し、4.5℃で1時間反応させリバピリンを合成した。生成したリバピリンは、文献の方法(国際特許公開WO/90/10080号)に従い、HPLCでリバピリンの生成率を測定した結果、対トリアゾール比9.2%でリバピリンが合成された。また、副産物の生成は認められなかった。

【0040】実施例5 菌体抽出液を用いたヌクレオシドアナログ(リバピリン)の合成

実施例4と同組成のトリアゾール、ウリジンを含むリン酸緩衝液(0.0 M)に、実施例3で調製された形質転換体JM109(pTrc-NE由来)の菌体抽出液を1.86 μ l添加(終濃度プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ10 unit/ml、ピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼとし5 unit/ml)として、5.0℃で8時間反応させた。実施例4と同様の方法でリバピリンの生成率を測定した結果、対トリアゾール比9.0%でリバピリンが合成されていることが確認された。また、先と同様、副産物の生成も認められなかった。

【0041】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* TH6-1株由来のプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ及

びピリミジン・ヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含む4.8 kb SacI-EcoRI DNA断片の制限酵素地図を示したものである。

【図2】図2は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* TH6-1株由来のプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を示したものである。図中、S.D.はSD配列を、Metはプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の翻訳開始コドン、stopはその停止コドン、Met of gppynはピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の翻訳開始コドンそれぞれを示す。

【図3】図3は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* TH6-1株由来のピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を示したものである。図中、S.D.はSD配列を、Metはピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の翻訳開始コドン、stop of gppunAはプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の終了位置をそれぞれ示す。

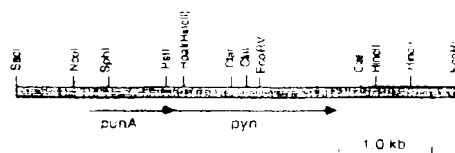
【図4】図4は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* TH6-1株由来のピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を示したものである。図中、stopはその停止コドンを示す。なお、図3及び4に示された塩基配列は一連の連続した塩基配列である。

【図5】図5は、組換えプラスミドベクター pTrc-punAの構築法を示したものである。

【図6】図6は、組換えプラスミドベクター pTrc-pynの構築法を示したものである。

【図7】図7は、組換えプラスミドベクター pTrc-NEの構築法を示したものである。

【図1】



100	200	300	400	500
TTATGGAAT	AGGCTGCTC	ATTAGCAAT	ATATATATA	ATGAAATAT
110	210	310	410	510
TCTGTATAG	CAAGCATCA	ATGCAATCA	ATAAATTTA	TTCTTTTAA
120	220	320	420	520
TTATGTTGCA	AGGATTTGAC	AAAACCTTTC	TTTAAAGATG	TAAATATAT
130	230	330	430	530
TTATGAAGAC	TTGAAATAAG	GAGCGTTAA	ATATGAATC	AACAATAT
140	240	340	440	540
TACAATTTT	AAAAGAAAAG	TTTCAACCT	CAATGAAAT	GGGTTTAA
150	250	350	450	550
TTTATGCTT	GTTCGGCCAT	GAGATTGAAC	AAATGATTA	AATTCCTAT
160	260	360	460	560
TAAATTTCC	TGTATGACG	CTTGAAAGGC	ATGAGTTCA	CTTCTATAC
170	270	370	470	570
AAAGGGAAC	AGTAGTGGT	ATGCAAGGC	CTTTCTATTA	TTACGAAGGA
180	280	380	480	580
ATAAGGTAAC	GTTCCTCTGT	CGCGTGATGA	AAGTTCTGC	TGTGAGGAC
190	290	390	490	590
TAAATCGGC	AGGTGTGTA	AATCAATCT	TTGAACCGG	CGATTTAATG
200	300	400	500	600
ATCATATTAA	TAAATCGGC	GGCAATCGC	TTATCGCTC	GAATGATTCT
210	310	410	510	610
TGCGCTTCC	AGACATGTC	GAAGCATATA	GTAAAGCACT	TGTTCAACT
220	320	420	520	620
TAGCAAAACA	CATCGGTTTA	CGTGTGCGG	AAGGTGTGTA	TGTCGCAAT
230	330	430	530	630
GTATGAAAC	GGCGGCAGAA	ATTGATATGA	TTGCTTAT	GGTTGCGCAT
240	340	440	540	640
TTTCAAGGCT	GGTTGAAGTC	ATGCTTGGC	GTATGCGGG	AATGGAAGTC
250	350	450	550	650
TTTATTTT	GAATATGGCT	GAATATATTA	TAATGATTC	GGTTACCAT
260	360	460	560	660
TGAAATAT	GGAAAAATA	AAATATGAT	TTTATGAT	TTTGAAGGCT
270	370	470	570	670
AAATATGAA	AAATTAAGG	AGAAATGAA	GAATGATG	AAATGATG
280	380	480	580	680
AAATATGAA	AAATTAAGG	AGAAATGAA	GAATGATG	AAATGATG

【図3】

10	20	30	40	50	60
CTGCACGTAT	TTTAGATCAG	CCGCTTACCC	ATCATGAAGT	GATCGAAACG	ACGGAAAAAG
PstI					
70	80	90	100	110	120
TAAAAGCTGA	CTTTTACGA	TTTGTGAAGC	CGATCGTACG	CAACATGCCG	AAAAATTAAA
				stop of qppua	
130	140	150	160	170	180
CGAGAAGGTG	AACGACGATG	AGAATGGTCG	ATTTAATTGA	GAAAAAACCT	GATGGTCATG
S.D.	Met				
190	200	210	220	230	240
CGTTAACGAA	AGAAGAAATT	CAGTTTATTA	TTCAAGCTTA	CACAAAACGC	GATATTCCTG
250	260	270	280	290	300
ATTATCAAAT	GAGCGCATT	GCGATGCCCA	TTTTTTTCCG	CGGCATGAAT	GAAGAAAGAG
310	320	330	340	350	360
CAGCGGAATT	GACGATGGCG	ATGGTGCATT	CAGCGGATAC	GATCGACCTT	TCGCCAATTG
370	380	390	400	410	420
AAGGAATTAA	AGTAGACAAA	CATTCAACCG	GCGGAGTGGG	CGATACAACA	ACGTTACTGC
430	440	450	460	470	480
TTGGCCCTCT	TGTCGCCTCC	GTCGGTGTTC	CGTTTGGGAA	AATGTCTGGG	CGCGGCCCTG
490	500	510	520	530	540
GACATACGGG	TGGAACGATC	GACAAACTAG	AATCGGTGCC	AGGTTTTCAC	GTTGAAATTA
550	560	570	580	590	600
CGAACGATGA	ATTTATCGAT	CTTGTCATA	AAAATAAAAT	TGCCGTTGTC	GGTCAGTCTG
610	620	630	640	650	660
GTAATTTGAC	GCCAGCGGAC	AAAAAGTTGT	ATGCGGCTTC	TGATGTGACG	GCAACGCTCA
670	680	690	700	710	720
ATAGCATTCG	GTTAATTGCC	TCATCGATTA	TCAGCAAAAA	AATTGCCGCA	GGGGCAGATG
730	740	750	760	770	780
CGATCCTACT	TGACGTAAAA	ACAGGTCTCG	CGCCGTTTAT	GAAAGATTTA	AACGATGCCA
790	800	810	820	830	840
AAGCATTAGC	GAAAGCGATG	CTCGATATCG	GAAATCGGCT	TGCGCGTAAA	ACGATGGCAA
850	860	870	880	890	900
TTATTTCTGA	TATGAGCCAG	CGGCTTGGTT	ATCCGATTCC	AAATGCGGTT	GAAGTGAAGC
910	920	930	940	950	960
AAGCGATTGA	TACGTTAAAA	CGAGAAGCTC	CACAAGATTT	CGAACAGCTG	TGCTTAATG
970	980	990	1000	1010	1020
TTGGTAGCCA	CATGGTATAT	TTAGCGGAAA	AACATCTTTC	GCTTGAAGAA	GCTCGTATTA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TGTTAGAAAA	AGCGATGAAA	GACGGTTGAC	CGCTTCAAAAC	ATTATAAAAG	TTCTTAGCTG

(その1)

[24]

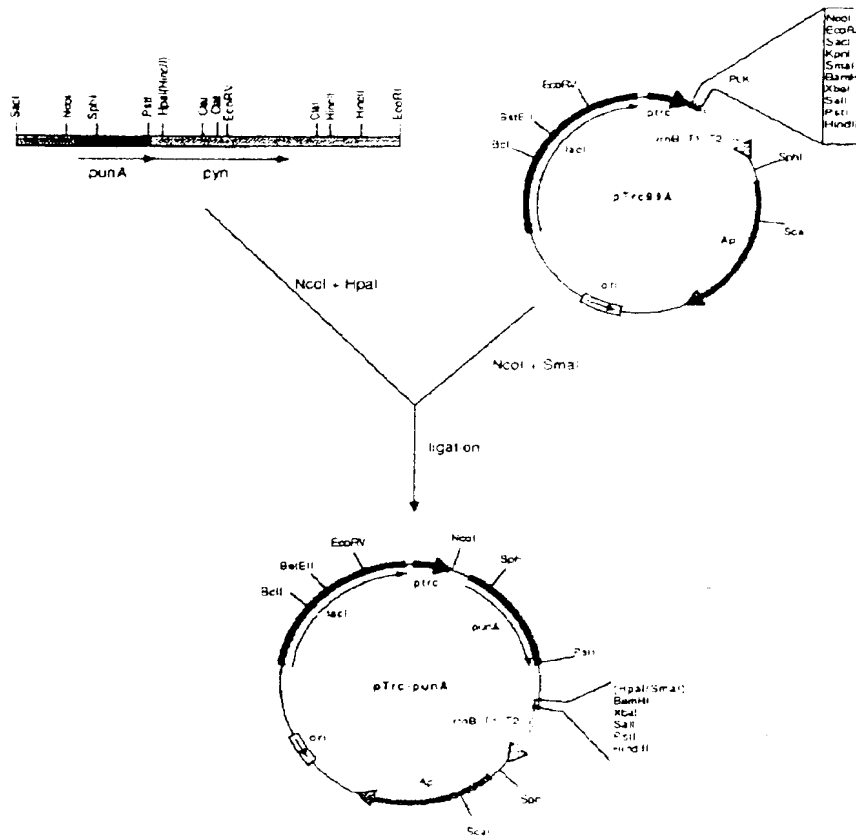
```

1090      1100      1110      1120      1130      1140
GGGAAGGTGG GGATGCATCT GTTGTGGATG AGCTAAGGAA ATTGGC AAA GAAAGATTA
1150      1160      1170      1180      1190      1200
TTATTTGAAGT AGAAGCCAAA GAAGATGGAT AGGTATCCGA AATTGTGGG GATG
1210      1220      1230      1240      1250      1260
GAAGGAGGGG GATGTGGCTT GGTGGAGGG GAGGGAGGAA AGAATCAAGG ATGCAITTA
1270      1280      1290      1300      1310      1320
ATTGTGGGTT GGTGCTTGGC AAAAAACTCG GTGATGGGT GAAAAAGGT CAAT GGTG
1330      1340      1350      1360      1370      1380
TTACAATTTA CAGCAACCGT GAACAACGCG ATGATGTAAA AAAAAAGTA TATGAAAAA
1390      1400      1410      1420      1430      1440
TTGCTATTTC ACCAACACCT GTTCAAGCTC CAACAATAAT TTAGGATAAA ATTGTGTA
1450      1460      1470      1480      1490      1500
GTGAAGGATT CATTCCTTCA GGTTTTTTTA TGTATAAAAA AATAAAAAAT GGAAAGGATG
1510      1520      1530      1540      1550      1560
GCAAGTATAA AGAAATGGAG GGTGGAGAT GAAGCGATT TTGTCATCT TTGCTATTG
1570      1580      1590      1600      1610      1620
GTTTCTTTT CTTCCAACCG TCCTTGTCCG GCGCGAAGAG TCGAAAAATTG AATTAAAGG
1630      1640      1650      1660      1670      1680
TGAGGCGCGA TCAGCAATTT TAATTGAGAG AGACACAGCG GCTGTTTTCT ATGAAAAAAA
1690      1700      1710      1720      1730      1740
TGCCCATGAG CCGCTTCCAC CAGCGAGCAT GACGAAATTT ATGACAATGC TTCTATTAT
1750      1760      1770      1780      1790      1800
GGAAGCGATT GATCAAGGAA AGTTGAAGAT AGAGGAGCGA GTGGGGCCAA GTGAATAAGG
1810
TGCATCGAT
Clai

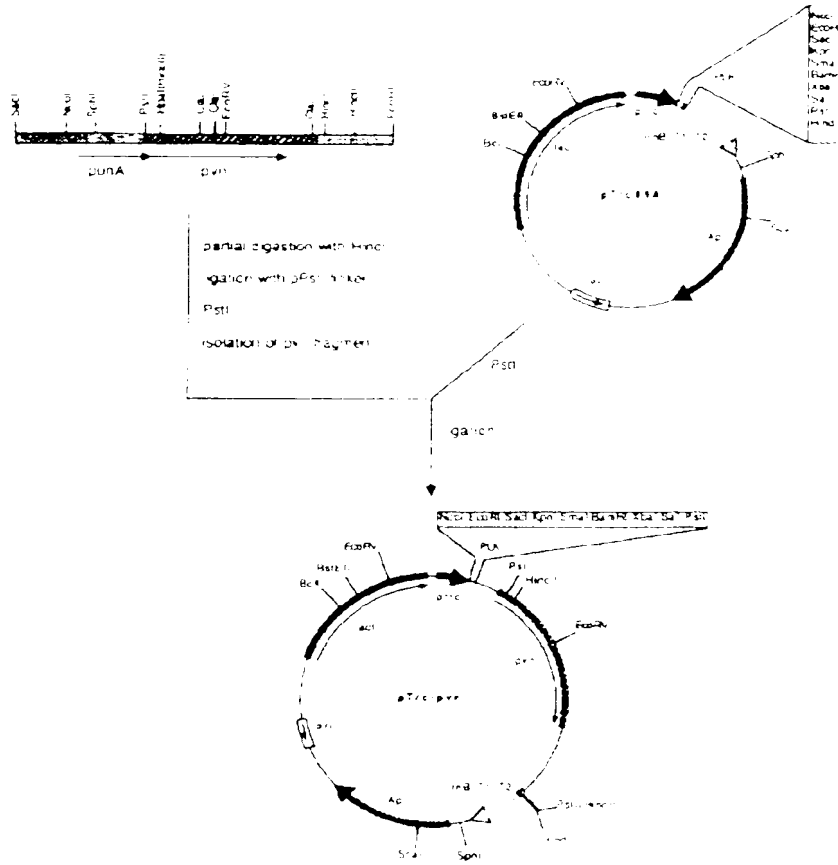
```

(その2)

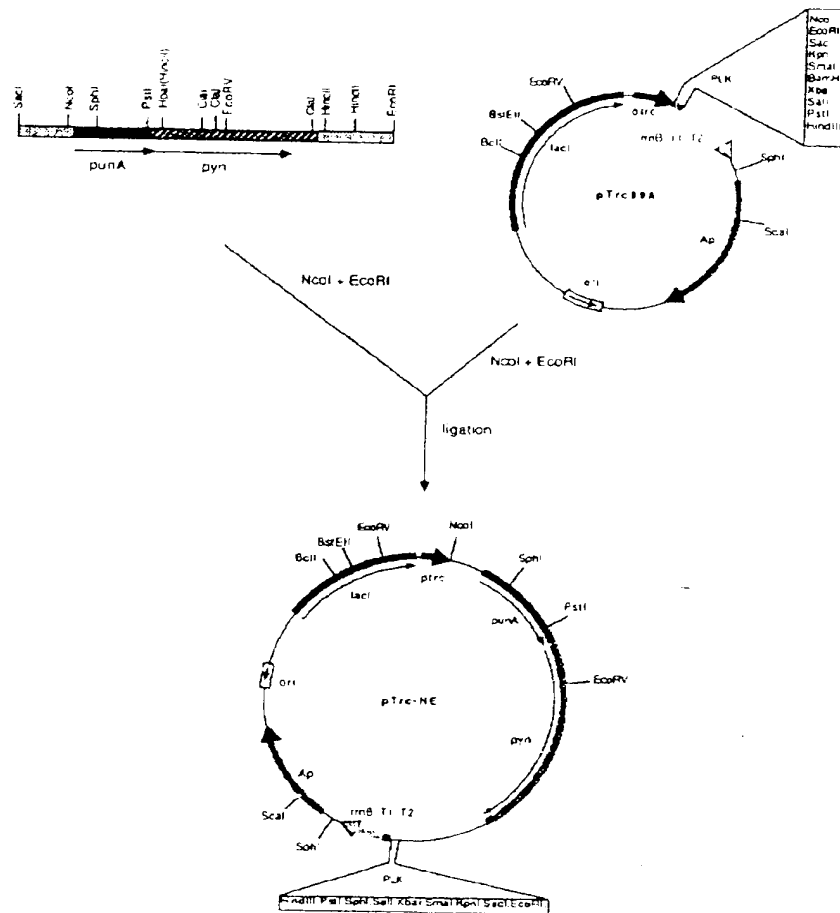
【図5】



[111]



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

A/C 1 2 N 15/54

C 1 2 R 1:07)

(C 1 2 N 1:21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9:10

C 1 2 R 1:19)

